

FR 2128587

1/1 DWPI - (C) Derwent

AN - 1972-61388T [39]

TI - L-5-hydroxytryptophane - biotechnical prepn using cultures including indole and serin

DC - B02 D16

PA - (ASAH ) ASAHI KASEI KOGYO KK

NP - 6

NC - 3

PN - DE2209591 A 0 DW1972-39 \*

- JP47020393 A 0 DW1972-43

- <b>FR2128587</b> A 0 DW1973-05

- JP74011435 B 19740316 DW1974-15

- JP48039693 A 19730611 DW1974-21

- JP76005479 B 19760220 DW1976-12

PR - 1971JP-0074670 19710927; 1971JP-0010955 19710304

IC - C07D-027/60 C12D-013/06

AB - DE2209591 A

Suitable micro-organisms are cultured in a nutrient medium contg a C and N source, inorganic salts and organic nutrients and the cells are then further cultured together with 5-hydroxyindole opt. mixed with serine. The micro-organisms used must form  $\geq 0.2$  mg/ml of L-tryptophane in a test for enzymatic activity of the tryptophane in a test for enzymatic activity bacteria such a *Corynebactrium* Sp. No. 14001 (FERM-P No 1048), NRRL-B 5395), *flavobacterium arborescens* ATCC 4358 etc, yeasts such as *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenella*, etc; anctinomycetes such as *Nocardia* or *Streptomyces* as well a moulds such as *Penicillium* or *Aspergillus*. Culturing pref. at pH 7-10 at 25-40 degrees C. L-5 HTP is an important metabolic intermediate for serotonin and is used e.g. in the treatment of depressions.

MC - CPI: B06-D01 B12-C06 D05-C01

UP - 1972-39

UE - 1972-43; 1973-05; 1974-15; 1974-21; 1976-12

Handwritten text at the top center, possibly a title or header, which is mostly illegible due to blurring.

Handwritten text at the top right corner, possibly a date or page number.

Handwritten mark or signature at the bottom left corner.

Handwritten mark or signature at the bottom left corner, below the previous mark.

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :

(A n'utiliser que pour  
le classement et les  
commandes de reproduction)

**2.128.587**

(21) N° d'enregistrement national

(A utiliser pour les paiements d'annuités  
les demandes de copies officielles et toutes  
autres correspondances avec l'I.N.P.I.)

**72.07459**

(13) DEMANDE  
DE BREVET D'INVENTION

1<sup>re</sup> PUBLICATION

(22) Date de dépôt ..... 3 mars 1972, à 15 h 13 mn.

(41) Date de la mise à la disposition du  
public de la demande..... B.O.P.I. — «Listes» n. 42 du 20-10-1972.

(51) Classification internationale (Int. Cl.) A 61 k 27/00//C 07 d 27/00; C 12 d 13/00.

(71) Déposant : Société dite : ASAHI KASEI KOGYO K.K., résidant au Japon.

Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet de Carsalade du Pont (A. Lourié & W. Flechner).

(54) Procédé de préparation de L-hydroxy-5 tryptophane sur microorganismes.

(72) Invention de :

(33) (32) (31) Priorité conventionnelle : Demandes de brevets déposées au Japon le 4 mars 1971,  
n. 10.955/1971 et le 27 septembre 1971, n. 74.670/1971 au nom de la demanderesse.

Vente des fascicules à l'IMPRIMERIE NATIONALE, 27, rue de la Convention - PARIS (15<sup>e</sup>)

La présente invention concerne un procédé pour la préparation de L-hydroxy-5 tryptophane (désigné ci-après en abrégé par "L-5HTP") à partir d'hydroxy-5 indole par emploi d'un microorganisme. Plus précisément, l'invention concerne un procédé pour la préparation de L-5HTP à partir d'hydroxy-5 indole avec ou sans sérine, où l'on utilise un microorganisme qui est capable de former du L-tryptophane à partir d'indole et de sérine.

Le L-5HTP est un produit intermédiaire du métabolisme extrêmement important, utilisé dans le système métabolique à l'intérieur du corps vivant qui réalise la synthèse d'hormone intracérébrale du type amine, telle que la L-hydroxy-5 tryptamine (sérotonine) ou la L-méthoxy-5 tryptamine, à partir du L-tryptophane. Récemment, le L-5HTP a été considéré avec un grand intérêt en tant qu'agent antidépressif et en tant que composé capable de manifester différents effets hormonaux et l'on a ressenti la nécessité de mettre au point un procédé permettant une préparation industrielle et économique de ce composé.

Parmi les procédés mycologiques pour la préparation de L-5HTP, on a décrit un procédé dans lequel le tryptophane est soumis à une oxyhydrogénation au moyen d'une enzyme telle que la tryptophane-5 hydroxylase du *Chromobacterium violaceum* (C. Mitoma et al. : Arch. Biochem. Biophys., 63 122 -1956-) et un procédé dans lequel l'hydroxy-5 indole est traité par une enzyme telle que la tryptophane synthétase de *Claviceps purpurea*, *Cordyceps militaris* ou *Aspergillus oryzae* (E. Mutschers et al. : Arch. Pharm., 301 291 -1968-). Ces procédés, toutefois, n'ont pas donné satisfaction par leurs rendements et par d'autres inconvénients. Les procédés de synthèse chimique ne sont pas économiques non plus. En conséquence, le produit est nécessairement coûteux.

Il est également bien connu que l'enzyme tryptophane synthétase qui favorise la formation du L-tryptophane à partir de l'indole (les enzymes qui favorisent cette réaction sont généralement appelées tryptophanes synthétases) est largement présente dans bien des microorganismes tels que les bactéries, les levures, les actinomycètes et les moisissures. En portant attention au fait que l'on peut s'attendre à obtenir du L-5HTP à partir d'hydroxy-5 indole lors de l'emploi des microorganismes

ci-dessus mentionnés, les inventeurs de la présente demande ont trouvé certains microorganismes déterminés qui sont susceptibles de former du L-5HTP à partir d'hydroxy-5 indole avec un rendement élevé et ils sont ainsi parvenus à la conception du nouveau procédé selon l'invention permettant d'obtenir des rendements élevés de L-5HTP à partir d'hydroxy-5 indole.

Un but de la présente invention est de fournir un nouveau procédé pour obtenir du L-5HTP à partir d'hydroxy-5 indole avec ou sans sérine.

Un autre but de l'invention est de fournir un nouveau procédé pour obtenir du L-5HTP à l'échelle industrielle et à faible prix de revient.

D'autres objectifs et d'autres avantages de l'invention apparaîtront à la lecture de la description qui suit.

Conformément à la présente invention, un microorganisme qui est capable de produire du tryptophane à partir d'indole et de sérine, est cultivé dans un milieu contenant des sources de carbone, des sources d'azote, des sels minéraux et des aliments organiques en présence ou en l'absence d'hydroxy-5 indole avec ou sans sérine. Dans le premier cas, du L-5HTP est produit dans le milieu. Dans le second cas, le microorganisme développé est isolé et mis en suspension dans une solution aqueuse contenant un phosphate à laquelle on ajoute de l'hydroxy-5 indole avec ou sans sérine.

Les microorganismes utilisables selon la présente invention sont ceux qui, lorsqu'ils sont soumis à la méthode de détermination mentionnée ci-après, peuvent conduire à au moins 0,2 mg/ml de L-tryptophane. Le procédé de détermination (essai sur la force de l'activité enzymatique du tryptophane synthétase) est le suivant :

Une préparation liquide contenant 2 mg/ml d'indole, 2 mg/ml de L-sérine, 100 mM de phosphate tampon à pH 8,0 et 40 mg/ml de cellule d'essai congelée, est laissée à réagir pendant un laps de temps défini. Puis une quantité définie du liquide réactionnel est développée par chromatographie sur papier et la fraction tryptophane est extraite à l'eau. Ensuite, l'extrait est soumis à une détermination colorimétrique selon le procédé au xanthidrol (S. R. Dickman et al. : J. E. C., 220 957 -1956-) et la concentration en L-tryptophane est déterminée sur une courbe normalisée.

BAD ORIGINAL

De nombreux microorganismes satisfont à l'essai d'activité enzymatique ci-dessus.

De tels microorganismes sont largement répandus dans les bactéries, les levures, les actinomycètes et les moisissures.

- 5 Parmi ces microorganismes, les bactéries sont celles qui appartiennent aux espèces *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Protaminobacter*, *Erwinia*, *Arthrobacter*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Sarcina*,  
10 *Xanthomonas* et *Achromobacter*. Des exemples de telles bactéries sont en particulier *Corynebacterium* sp. No. 14001 (FERM-P No. 1048) ; *Corynebacterium melassecola* ATCC 17965 ; *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC 6872 ; *Microbacterium ammoniaphilum* ATCC 15354 ; *Micrococcus luteus* ATCC 21102 ; *Bacillus subtilis* ATCC  
15 14593 ; *Flavobacterium arborescens* ATCC 4358 ; *Agrobacterium tumefaciens* IFO 3053 ; *Aerobacter aerogenes* IFO 3317 ; *Escherichia coli* ATCC 9637 ; *Proteus mirabilis* IFO 3349 ; *Pseudomonas fragi* IFO 3458 ; *Protaminobacter alboflavus* IFO 3707 ; *Erwinia carotovora* IFO 3057 ; *Arthrobacter globiformis* ATCC 8010 ;  
20 *Serratia marcescens* IFO 3046 ; *Staphylococcus citreus* ATCC 4012 ; *Sarcina lutea* ATCC 15176 ; *Xanthomonas pruni* IFO 3511 et *Achromobacter petrophilum* FARM-P 239. Parmi celles-ci, *Corynebacterium* sp. No. 14001 (FERM-P No. 1048) et *Agrobacterium tumefaciens* IFO 3053 sont les plus avantageuses. Des exemples de levures  
25 comprennent *Hansenula anomala* IFO C113 ; *Candida petrophilum* ATCC 20226 ; *Prettanomyces petrophilum* ATCC 20224 ; *Torulopsis petrophilum* ATCC 20225 et *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754. Des exemples d'actinomycètes comprennent *Hocardia asteroides* IFO 3384 et *Streptomyces aureus* ATCC 3306. Comme exemples de  
30 moisissures on peut citer *Penicillium chrysogenum* ATCC 15241 et *Aspergillus oryzae* IFO 4075.

- Les souches *Corynebacterium* sp. No. 14001 et *Agrobacterium tumefaciens*, à titre d'exemple, peuvent produire du L-tryptophane en quantité de 3,80 mg/ml et 3,75 mg/ml, respectivement, conformément à la méthode de détermination.

- Les microorganismes utilisables dans la présente invention ne sont pas limités exclusivement à ceux qui sont mentionnés ci-dessus, mais ils comportent également tous microorganismes appartenant à l'espèce desdites souches et capables  
40 de produire du L-tryptophane à partir d'indole et de sérine.

BAD ORIGINAL

Leurs variants et mutants sont également utilisables dans la présente invention.

Parmi les microorganismes utilisés selon la présente invention, *Corynebacterium* sp. No. 14001 (FERM-P No. 1048) constitue une nouvelle souche, de sorte que les propriétés mycologiques de cette souche sont indiquées ci-après.

1) Caractéristiques morphologiques :

Baguettes fines, 0,5 à 1,0 par 3,0 microns. Très diverses dans leurs formes ; baguette droite, ramifiée, etc, non en mouvement. Gramme positif.

2) Etat de croissance :

a) Bouillon de culture sur gélose en culot : croissance ondulée et surélevée ; circonférence ondulée et vermillon pâle.

b) Bouillon de culture sur gélose inclinée : croissance granuleuse et degré moyen. Aucun changement n'est observé dans le milieu ; vermillon pâle.

c) Bouillon de culture liquide : croissance moyenne avec légère turbidité. Un précipité se forme.

d) Culture en milieu de gélatine : pas de liquéfaction.

e) Lait de tournesol : inchangé.

3) Propriétés physiologiques :

a) Réduction des nitrates : observée.

b) Formation d'indole : aucune.

c) Formation d'hydrogène sulfuré : légère.

d) Formation d'ammoniac : observée.

e) Essai VP : négatif.

f) Essai MR : négatif.

g) Hydrolyse de l'amidon : positive.

h) Catalase : positive.

i) Décomposition des saccharides : acides formés à partir du glucose, du fructose, du mannose et du glycérol. Pas de production de gaz.

j) Domaine de croissance : pH 4,0 à 9,0, 20 à 40°C.

En fonction de ce qui précède, on considère, conformément au "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 7th ed.", que cette souche est l'une des souches qui appartiennent à l'espèce *Corynebacterium*. Toutefois, la présente souche diffère de *Corynebacterium pseudotuberculosis* dans son comportement à

la réduction par les nitrates et à d'autres réactions, bien qu'elle lui soit similaire par l'état de croissance. De plus, la présente souche ne coïncide pas avec *Corynebacterium murisepticum* du fait qu'elle ne se développe pas en longs filaments.

5 Ainsi, *Corynebacterium* sp. No. 14001 (FERM-P No. 1048) est une nouvelle souche.

Cette souche est déposée au "Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Chiba City, Japon" sous la référence FERM-P No. 1048. Cette souche

10 est également déposée au Département de l'Agriculture des Etats-Unis au "Northen Regional Research Laboratory" à Peoria, Illinois, Etats-Unis d'Amérique, où elle a reçu la référence NRRL B-5395.

Le milieu utilisé selon la présente invention est

15 constitué de sources de carbone, de sources d'azote, de sels minéraux, de matières nutritives organiques naturelles, etc, qui sont préférées en vue d'une croissance favorable du micro-organisme utilisé et d'une production régulière de L-5HTP. Des exemples de sources de carbone sont le glucose, le fructose, le

20 sucrose, le mannose, l'amidon, le sorbitol, le glycérol, les alcools, l'acide acétique et l'acide citrique. Ces sources de carbone peuvent être utilisées soit seules soit par combinaison de deux d'entre elles ou plus. La quantité des sources de carbone n'est pas essentielle mais elle est de préférence comprise

25 entre environ 1 et 10. (poids/volume). Les sources d'azote sont par exemple l'ammoniac, l'urée, le sulfate d'ammonium, l'acétate d'ammonium, le nitrate d'ammonium et le nitrate de sodium. Ces sources d'azote peuvent également être utilisées soit seules soit par combinaison de deux ou plus. Les sels minéraux sont

30 par exemple les sels de sodium, de potassium, de magnésium, de manganèse, de fer ou de calcium, de l'acide phosphorique ou de l'acide chlorhydrique. Des exemples de matières nutritives organiques qui favorisent le développement de la souche utilisée comprennent la peptone, les extraits de viande, une liqueur de

35 macération de blé (corn steep liquor), des acides casamino, des extraits de levure et de la farine de soja. En outre, une faible quantité de vitamines ou d'acides nucléiques peut être incorporée dans le milieu de culture.

Pour la réaction de formation du L-5HTP, on ajoute le

40 produit de départ, c'est-à-dire l'hydroxy-5 indole seul ou avec



de la sérine. La sérine peut être soit sous forme L soit sous forme DL. L'addition est effectuée de la manière suivante.

Un premier mode consiste à ajouter le produit de départ directement dans le milieu pendant que la culture est effectuée. La formation de L-5HTP est réalisée simultanément avec la croissance du microorganisme. Le second mode consiste à mettre en suspension dans une solution aqueuse de phosphate des cellules déjà développées qui ont été obtenues par culture du microorganisme dans le milieu ci-dessus mentionné et isolation, puis à y ajouter le produit de départ. Dans ce second mode on peut remplacer les cellules vivantes par des cellules sèches soumises à un traitement de cryodessiccation, des cellules broyées, des cellules traitées par les ultrasons ou des cellules traitées par un solvant tel que l'acétone, l'éthanol, le toluène, etc. Les quantités d'hydroxy-5 indole et de sérine à incorporer ne sont pas essentielles, mais elles sont de préférence de l'ordre de 0,02 à 2,0 g/dl chacune. Elles peuvent être incorporées soit en une seule fois soit par additions successives.

La culture peut être effectuée, selon le microorganisme utilisé, par une culture avec agitation ou avec introduction d'air dans des conditions aérobies, ou par une culture au repos. Le pH pendant la culture avant l'addition d'hydroxy-5 indole est de préférence compris entre 4 et 9. La température de culture est comprise entre 20°C et 40°C et de préférence entre 25°C et 35°C. Après l'addition d'hydroxy-5 indole, le pH est de préférence compris entre 7 et 10 et la température entre 25°C et 40°C. Quel que soit le mode d'incorporation choisi, on peut utiliser n'importe quel agent de neutralisation connu, tel que l'ammoniac, la soude, la chaux, le carbonate de calcium et l'acide chlorhydrique comme agent de neutralisation pour le réglage du pH. Le temps de culture ou le temps de réaction varie en fonction du mode d'addition du produit de départ, de la concentration du produit de départ ajouté et du type de souche utilisé. Toutefois, d'une manière générale, le L-5HTP se forme en un temps de 1 à 5 jours. Selon l'invention, 0,03 à 1,0 g/dl de L-5HTP peut être accumulé dans la liqueur de culture (ou dans le liquide de réaction). Le L-5HTP ainsi accumulé peut être isolé conformément à un procédé connu en soi. Ainsi, le L-5HTP est absorbé sur du charbon actif ou sur une résine échangeuse d'ions telle que la résine Dowex-1 ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ), élué

par un solvant organique tel que l'éthanol chaud ou par une solution aqueuse d'acide acétique, concentré puis récupéré par addition d'un alcool inférieur tel que par exemple l'éthanol.

Selon l'invention, l'identification du L-5HTP est effectuée en identifiant le L-tryptophane selon le procédé au Xanthidrol déjà mentionné.

L'invention est illustrée en détail ci-après dans des exemples de mise en oeuvre particuliers. Sauf indication contraire, tous les pourcentages sont exprimés en poids par unité de volume.

Exemple 1 :

Le microorganisme *Corynebacterium* sp. No. 14001 (FERM-P No. 1048 : NRRL B-5395) est injecté dans un flacon à agitation contenant 50 ml d'un milieu aqueux (pH 7,0) constitué de 1,0 % de peptone, 1,0 % d'extrait de viande, 0,4 % de chlorure de sodium et 0,1 % d'extrait de levure, où il est cultivé avec agitation à 30°C pendant 24 heures. Les cellules obtenues sont ensuite recueillies et mises en suspension dans 60 ml d'une solution tampon de phosphate (pH 8,5). A la suspension ainsi obtenue on ajoute 40 mg d'hydroxy-5 indole, 40 mg de L-sérine et 120 mg de glucose. Après avoir complété le volume total de la suspension à 20 ml par addition d'eau, la suspension est laissée sous agitation à 30°C pendant 16 heures. La quantité de L-5HTP finalement accumulée dans le liquide de réaction est de 2,94 mg/ml.

Le liquide de réaction est chauffé et les cellules en sont éliminées. Le liquide surnageant est traité dans une colonne à charbon actif jusqu'à absorption du L-5HTP. On ajoute alors une solution aqueuse d'éthanol chaude pour éluer le L-5HTP. La solution est condensée sous pression réduite pour isoler le L-5HTP. Rendement : 55 mg.

Par ailleurs, on effectue la même réaction que ci-dessus pendant 32 heures, mais en effectuant trois additions de 20 mg d'hydroxy-5 indole et de 20 mg de L-sérine respectivement à la 8ème heure, à la 16ème heure et à la 24ème heure après le début de la réaction. Dans ce cas la quantité de L-5HTP accumulée est de 7,01 mg/ml.

Exemple 2 :

Chacun des microorganismes indiqués dans le tableau 1 est injecté dans un flacon à agitation contenant 50 ml d'un

- milieu aqueux (pH 7,0) présentant la composition suivante :
- 3 % de glucose, 0,6 % d'urée, 0,3 % de peptone, 0,3 % d'extrait de levure, 0,1 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 %  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,05 %  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  et 0,001 %  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . La culture est effectuée avec agitation à 30°C. A la 32ème heure après le début de la mise en culture, on ajoute au milieu 1,0 mg/ml d'hydroxy-5 indole et 2,0 mg/ml de DL-sérine et la culture est poursuivie pendant encore 24 heures. On obtient les quantités de L-5HTP formées dans ce milieu qui sont indiquées dans le tableau 1 ci-après. La séparation est effectuée comme indiqué dans l'exemple 1.

Tableau 1

	Microorganisme	L-5HTP (mg/ml)
	<i>Corynebacterium melassecola</i> ATCC 17965	0,39
15	<i>Brevibacterium ammoniagenes</i> ATCC 6872	0,25
	<i>Microbacterium ammoniaphilum</i> ATCC 15354	0,37
	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 21102	0,32
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 14593	0,33
	<i>Flavobacterium arborescens</i> ATCC 4358	0,60
20	<i>Aerobacter aerogenes</i> IFO 3317	0,64
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 9637	0,61
	<i>Proteus mirabilis</i> IFO 3849	0,46
	<i>Pseudomonas fragi</i> IFO 3458	0,50
	<i>Protaminobacter alboflavus</i> IFO 3707	0,51
25	<i>Erwinia carotovora</i> IFO 3057	0,61
	<i>Arthrobacter globiformis</i> ATCC 8010	0,26
	<i>Serratia marcescens</i> IFO 3046	0,52
	<i>Staphylococcus citreus</i> ATCC 4012	0,27
	<i>Sarcina lutea</i> ATCC 15176	0,42
30	<i>Achromobacter petrophilum</i> FARM-P 239	0,50
	<i>Xanthomonas pruni</i> IFO 3511	0,52
	<i>Nocardia asteroides</i> IFO 3384	0,56
	<i>Streptomyces aureus</i> ATCC 3309	0,29
	<i>Penicillium chrysogenum</i> ATCC 15241	0,27
35	<i>Aspergillus oryzae</i> IFO 4075	0,30

Exemple 3 :

- Chacun des microorganismes indiqués sur le tableau 2 est injecté dans un flacon à agitation contenant 50 ml d'un milieu aqueux (pH 6,5) présentant la composition suivante :
- 5,0 % de glycérol, 0,2 %  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0,2 % d'urée, 0,1 % d'extrait

de levure, 0,1 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 %  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,05 %  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,01 %  $\text{NaCl}$ , 0,001 %  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  et 1,0 %  $\text{CaCO}_3$ . La culture est effectuée avec agitation à 30°C. A la 24ème heure après le début de la mise en culture, on ajoute 1,5 mg/ml d'hydroxy-5 indole et la culture est poursuivie pendant encore 24 heures pour accumuler le L-5HTP dans la liqueur de culture. La quantité de L-5HTP accumulé est celle indiquée dans le tableau 2. La solution est traitée comme dans l'exemple 1.

Tableau 2

10	Microorganisme	L-5HTP (mg/ml)
	<i>Hansenula anomala</i> IFO 0118	0,59
	<i>Candida petrophilum</i> ATCC 20226	0,38
	<i>Brettanomyces petrophilum</i> ATCC 20224	0,37
15	<i>Torulopsis petrophilum</i> ATCC 20225	0,26
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 7754	0,28

Exemple 4 :

On répète la procédure de l'exemple 1, si ce n'est que le surnageant d'un liquide de cellules soumises à un traitement par les ultrasons (10 KC, 10 min.) est utilisé comme source d'enzymes pour obtenir 0,39 mg/ml de L-5HTP.

Exemple 5 :

Le microorganisme *Agrobacterium tumefaciens* IFO 3058 est soumis à la même culture que dans l'exemple 2. Au moment de la 32ème et de la 48ème heure après le début de la mise en culture, on ajoute 1,0 mg/ml d'hydroxy-5 indole et 2,0 mg/ml de DL-sérine et la culture est poursuivie pendant encore 12 heures pour obtenir 2,48 mg/ml de L-5HTP. La séparation est effectuée conformément à l'exemple 1.

REVENDICATIONS

1. Procédé pour la préparation de L-hydroxy-5 tryptophane, caractérisé en ce qu'il comporte la culture d'un micro-organisme capable de produire du L-tryptophane à partir d'indole et de sérine dans un milieu de culture contenant des sources de  
5 carbone, des sources d'azote, des sels minéraux et des matières organiques nutritives et la mise en contact des cellules avec de l'hydroxy-5 indole éventuellement en mélange avec de la sérine.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en  
10 ce que le microorganisme produit au moins 0,2 mg/ml de L-tryptophane selon l'essai d'activité enzymatique de tryptophane synthétase.

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le microorganisme est choisi parmi :

15 a) les bactéries appartenant aux espèces *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Protaminobacter*, *Erwinia*, *Arthrobacter*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Sarcina*, *Xanthomonas* et *Achromobacter* ;

20 b) les levures appartenant aux espèces *Hansenula*, *Candida*, *Brettanomyces*, *Torulopsis* et *Saccharomyces* ;

c) les actinomycètes appartenant aux espèces *Nocardia* et *Streptomyces* ;

25 d) les moisissures appartenant aux espèces *Penicillium* et *Aspergillus*.

4. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le microorganisme est choisi parmi *Corynebacterium* sp. No. 14001 (FERM-P No. 1048) ; *Corynebacterium melassecola* ATCC 17 965 ; *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC 6872 ; *Micro-*  
30 *bacterium ammoniaphilum* ATCC 15354 ; *Micrococcus luteus* ATCC 21102 ; *Bacillus subtilis* ATCC 14593 ; *Flavobacterium arborescens* ATCC 4358 ; *Agrobacterium tumefaciens* IFO 3058 ; *Aerobacter aerogenes* IFO 3317 ; *Escherichia coli* ATCC 9637 ; *Proteus mirabilis* IFO 3849 ; *Pseudomonas fragi* IFO 3458 ; *Protaminobacter*  
35 *alboflavus* IFO 3707 ; *Erwinia carotovora* IFO 3057 ; *Arthrobacter globiformis* ATCC 8010 ; *Serratia Marcescens* IFO 3046 ; *Staphylococcus citreus* ATCC 4012 ; *Sarcina lutea* ATCC 15176 ; *Xanthomonas pruni* IFO 3511 ; *Achromobacter petrophilum* FARM-P 239 ;

Hansenula anomala IFO 0118 ; Candida petrophilum ATCC 20226 ; Brettanomyces petrophilum ATCC 20224 ; Torulopsis petrophilum ATCC 20225 ; Saccharomyces cerevisiae ATCC 7754 ; Nocardia asteroides IFO 3384 ; Streptomyces aureus ATCC 3309 ; Penicillium chrysogenum ATCC 15241 et Aspergillus oryzae IFO 4075.

5        5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'on ajoute à un milieu de culture l'hydroxy-5 indole éventuellement en mélange avec de la sérine et en ce que l'on poursuit la culture.

10       6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'on interrompt la culture pour isoler les cellules et en ce que les cellules sont mises en suspension dans une solution aqueuse contenant de l'acide phosphorique à laquelle l'on ajoute l'hydroxy-5 indole ou son  
15 mélange avec de la sérine.

7. Procédé selon la revendication 5 ou 6, caractérisé en ce que l'hydroxy-5 indole ou son mélange avec de la sérine est incorporé en une seule fois ou par additions successives.

20       8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que la culture est effectuée après addition d'hydroxy-5 indole à un pH de 7 à 10 et à une température de 25°C à 40°C.

25       9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que l'hydroxy-5 indole et éventuellement la sérine sont ajoutés chacun en quantité comprise entre 0,02 et 2,0 g/dl.